

文章编号: 1001-1498(2002)02-0207-05

石斛菌根真菌液培生长特性的研究

陈连庆, 裴致达, 韩宁林, 张守英

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 石斛菌根真菌液培生长特性研究结果表明: F9903 菌株最适增殖生长温度是 30℃, 其菌丝体平均每天生长速度最快, 达 1.222 cm; 培养液 pH 3~8 范围内 F9903 菌株均能生长, 以 pH 值 7 时菌丝体增殖效果最好, 干菌丝质量 1.450 mg mL⁻¹, 增殖 131.8 倍; 提供的 8 种 N 源(硫酸铵、硝酸铵、硝酸钙、硝酸钾、脲、酒石酸铵、甘氨酸、谷氨酸)中, 吸收利用效果最好的是酒石酸铵 N 源, 菌丝体干质量 1.684 mg mL⁻¹, 增殖 153 倍, 谷氨酸次之; 提供的 8 种 C 源(葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘露醇、糊精、可溶性淀粉), F9903 菌株均能吸收利用, 尤以果糖 C 源增殖效果最高, 菌丝体干质量 1.501 mg mL⁻¹, 增殖 136.5 倍; 培养液中不同含量的速效 P 对 F9903 菌株菌丝体增殖效果, 以处理 3(磷酸二氢钾 1 mg mL⁻¹)最佳, 菌丝体干质量 1.256 mg mL⁻¹, 增殖达 114.2 倍。

关键词: 石斛; 菌根真菌; 液体培养; 生长特性

中图分类号: S718.81

文献标识码: A

石斛是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)的草本植物, 是我国传统名贵的中药材。石斛菌根是特殊的内生菌根类型, 称为“兰花菌根”^[1]。它与一般内生菌根(简称 VA 菌根)在菌根真菌的种类、感染途径及根内组织结构上, 有着本质上的区别。虽然石斛菌根真菌同样是异养型的生活方式, 但它不是通过寄主细胞汲取碳水化合物, 而是从其它活的有机体或死的残留有机物上, 分解摄取 C 源, 并为附生的石斛提供必要的水分与养分, 所以石斛植物的整个生命过程, 都是与菌根真菌联系在一起的^[2]。经作者系列研究业已证明, 轻如尘埃、分化未完全、无胚乳的细微石斛种子, 从种胚萌发 原球茎 幼苗分化 成株, 菌根真菌起着决定性的作用^[3]。

通过生物测定, 丝核菌(*Rhizoctonia* sp.) 具有生长快速, 扩繁容易, 拮抗性强的特点, 适生范围广, 菌根效益显著等特点, 在石斛共生真菌中是大有应用前景的真菌^[4~7]。为了深入研究该真菌, 为今后对其开发利用与生产推广提供科学依据, 现将丝核菌 F9903 菌株有关液培生长特性研究结果报道如后。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用丝核菌, 系从浙江省富阳市山区野生铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Ldl.) 的菌根中, 通过无菌操作分离、培养、纯化、复壮而获得, 编号为 F9903 菌株。

收稿日期: 2001-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目“石斛共生真菌生物学基础研究”(39870622); 浙江省自然科学基金项目(397030)

作者简介: 陈连庆(1943-), 男, 河北唐山人, 研究员。

培养液应用改良的菌根真菌培养基配方。

1.2 方法

1.2.1 温度测试 在灭菌的培养皿中,放入无菌的培养液(厚度 3 mm 左右),接种同龄定量的一级菌种块(约 4 mm²),恒温于 0~45 10 个梯度中静置培养。每个梯度重复 6 次,每隔 1 d 测定接种点菌落扩展直径,培养时间 6 d。

1.2.2 pH 梯度试验 培养液 pH 值 3~8,每 0.5 为一个梯度,试验设计 11 × 3(处理 × 重复)。在同温条件下(30 ± 0.5),置于 HSZ-1 型生物液体震荡台上,进行菌丝体振荡与间歇培养。根据预备试验结果,该菌丝体增殖生物量最大值的培养天数(8 d),作为本试验周期天数。

1.2.3 N 源试验 无机 N(硫酸铵、硝酸铵、硝酸钙、硝酸钾)、有机 N(脲、酒石酸铵、甘氨酸、谷氨酸)为 9 个处理,每处理重复 3 次。在相同的基础培养液中,加入各种 N 源,然后接入等量、活力旺盛的菌丝体(折合干菌丝 1.1 mg),培养液 pH 值为 7,在温度 30 ± 0.5 条件下进行振荡与间歇增殖培养(培养周期 8 d)。

1.2.4 C 源试验 在无 C 源的基础培养液中,分别加入单糖(葡萄糖、果糖)、双糖(蔗糖、麦芽糖)、多糖(糊精、可溶性淀粉)、醇类(乙醇、甘露醇),并设一对照,试验设计 9 × 3(处理 × 重复)。接种量及培养条件同 N 源试验。

1.2.5 P 素试验 取无 P 源的基础培养液,分别加入可溶性磷酸二氢钾,处理分别是 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg mL⁻¹,每处理重复 3 次。培养方法同上。

1.2.6 菌丝体生物量测定 除平板温度试验外,试验处理均采用 250 mL 三角瓶,各加入 100 mL 无菌培养液。经接种 培养(8 d) 抽提 过滤 无菌水冲洗 105 烘干恒质量,获得菌丝体生物量。

2 结果与分析

2.1 温度对 F9903 菌株菌丝体生长的影响

图 1 结果表明:菌株 F9903 在 0~45 10 个温度梯度中,其菌丝体的增殖生长表现出明显的差异。当恒温 30 时,该接种菌块萌动生长最早(24 h 内),平均每天生长速度达 1.222 cm,显示出最大的优势。而随着培养温度小于 30 和大于 30,逐渐地影响菌丝体的生长速度。在 0~10 以下菌丝体近似休眠,停止萌动生长。当温度达到 10 以后,经 6 d 的培养,菌丝体开始萌动,生长速度非常缓慢。当温度不断上升时,该菌丝体生长速度也不断加快,至 30 时达到最高值。但温度超过 30 以后,菌丝体的生长速度陡然下降,当温度达到 45 时,菌丝体停止萌动,6 d 后变黄枯萎,已近衰亡。

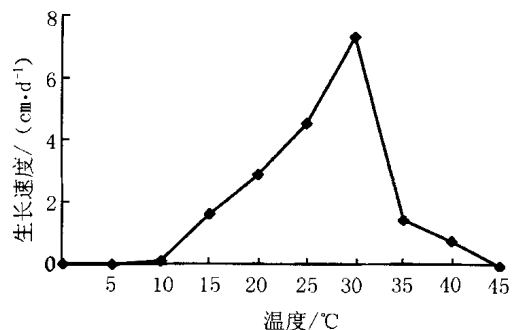


图 1 不同温度对菌丝增殖的影响

2.2 pH 适应范围

菌株 F9903 在不同 pH 条件下生长反应结果(图 2)说明:F9903 菌株对培养液 pH 值的反应不敏感,适应范围广。pH 3~4 时菌丝生长非常快,菌丝体增殖从 14.2 倍上升到 103.9 倍。从 pH 4~8 的 9 个梯度中,菌丝体增殖一直保持在 100 倍以上,pH 值 7 时达到最高峰,菌丝体干

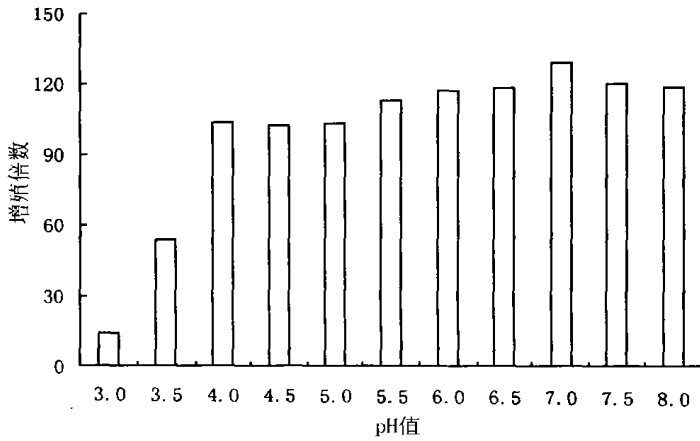


图 2 不同 pH 对菌丝增殖的影响

质量 1.450 mg mL^{-1} ,增殖 131.8 倍。从 pH 7 到 pH 4,虽然酸度不断提高,但菌丝体增殖倍数的下降速度缓慢。pH 值提高到 8 时,菌丝体增殖依然达到 121.4 倍。可见 F9903 菌株对培养液的 pH 值适应范围相当广,尤其是 pH 值在碱性范围内,增殖生长量也较高,所以常见石斛附生在石灰岩基质上,也能生长繁茂。

2.3 不同 N 源的增殖生长效果

图 3 表明:F9903 菌株利用不同 N 源,其增殖生长效果不同。无机 N 源中,氨态 N 能较好的吸收利用,硝态 N 几乎不可利用,硫酸铵和硝酸铵提供的 N 源,可使菌丝体增殖量比接种量分别提高 113.1 倍和 108.8 倍,而硝酸钙和硝酸钾提供的 N 源接种的菌丝体几乎没有增殖生长。有机 N 源中,脲、酒石酸铵、谷氨酸提供的 N 源,该菌株均能很好的吸收利用,菌丝体增殖量分别是接种量的 142.2 倍、153.1 倍和 148.6 倍,以酒石酸铵 N 源对菌丝体增殖干质量为最高 (1.684 mg mL^{-1}),而甘氨酸提供的 N 源不可利用,与对照无 N 源培养结果一样,接种的菌丝体无增殖生长。硝酸钙、硝酸钾、甘氨酸等提供的 N 源,难以利用,其机理有待进一步研究。

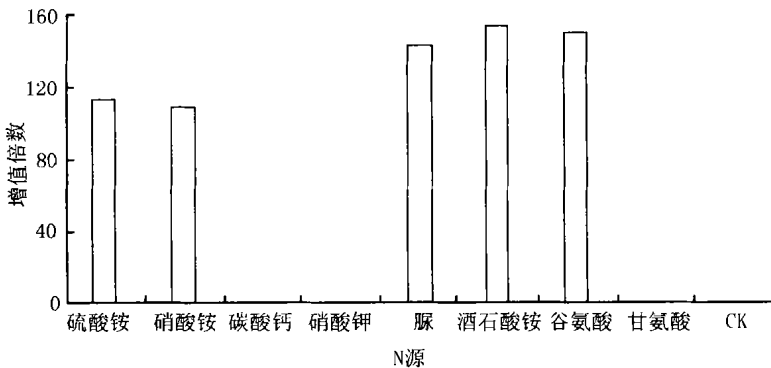


图 3 不同 N 源对菌丝增殖的影响

2.4 不同 C 源的吸收利用效果

F9903 菌株对提供的 8 种不同 C 源,均有不同程度的吸收利用。从图 4 中看出,F9903 菌株对单糖 C 源利用效果较好,尤以果糖 C 源利用效果最佳,菌丝体增殖的干质量为 1.501

mg mL^{-1} ,增加达 136.5 倍。不同 C 源利用效果排序:果糖 > 蔗糖 > 葡萄糖 > 甘露醇 > 麦芽糖 > 乙醇 > 糊精 > 可溶性淀粉 > CK。对照处理无 C 源,所以 F9903 菌株菌丝体不能增殖生长。

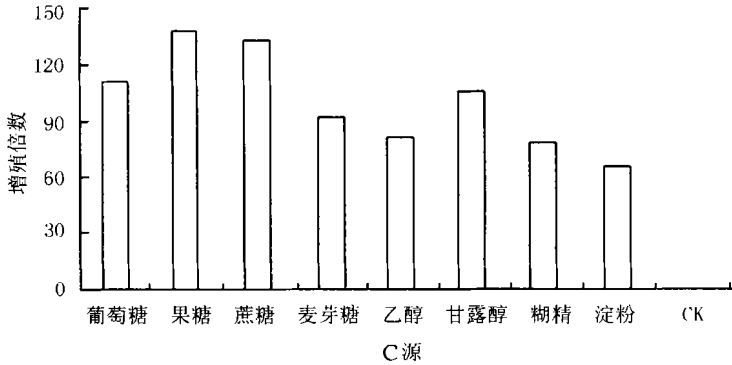


图 4 不同 C 源对菌丝增殖的影响

在以上无 N 源和无 C 源的对照处理中,菌丝体都停止增殖生长,其结果表明:C 与 N 是 F9903 菌株不可缺少的重要的营养元素,没有 C、N 来源,碳水化合物、氨基酸、蛋白质和核酸等就不能合成,同时也断绝了能量来源,菌丝体不能生长。

2.5 不同有效 P 含量对 F9903 菌株增殖生长的效应

在培养液中,有效 P 不同含量的变化,对菌丝体增殖生长产生不同影响。1 mL 溶液中,含磷酸二氢钾 1 mg (纯 P 为 11.4%) 时,F9903 菌株菌丝体增殖生长效果最佳,菌丝体干质量达 1.256 mg mL^{-1} ,增殖 114.2 倍。对照处理(无 P 源)的 F9903 菌株增殖生长量为最小,只增加 0.11 倍。这说明培养液虽然含有适量 C、N 营养元素,但缺 P 时,仍然严重影响该菌株的增殖生长。图 5 还表明:随着培养液 P 含量成倍增加,其含量高达 8 倍时,菌丝体增殖倍数(94.2 倍)虽有缓慢下降的趋势,但还没有显示出高浓度 P 的毒害现象。

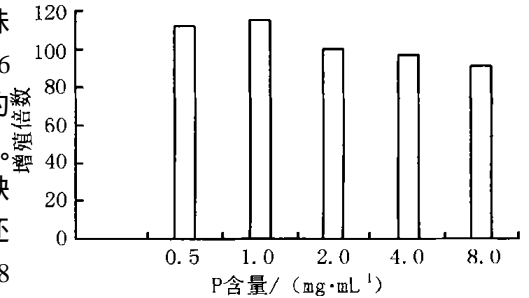


图 5 不同 P 含量对菌丝增殖的影响

3 小结

(1) 通过 0~45 10 个温度梯度培养试验,发现丝核菌 F9903 菌株萌动最早(24 h 内),平均每天生长速度最快(1.222 cm)的温度是 30,温度升高和降低均影响其生长速度。10 以下,菌丝 6 d 中不能萌动;0 和 45 时菌丝停止生长。

(2) F9903 菌株在 pH 3~8 范围中均能增殖生长,以 pH 7 时菌丝体增殖生长最显著,干质量达 1.450 mg mL^{-1} ,增殖 131.8 倍。随着 pH 下降或升高菌丝体增殖生长出现递减趋势。

(3) 有机 N 的酒石酸铵提供的 N 源,F9903 菌株吸收利用最强,菌丝体干质量最大,为 1.684 mg mL^{-1} ,增殖 153 倍,谷氨酸次之。无机的铵态 N 对菌丝体的增殖作用优于硝态 N,硝酸钙、硝酸钾、CK 处理菌丝没有增殖生长。

(4) 试验提供的单糖、双糖、多糖与醇类 C 源,均能被 F9903 菌株吸收利用,利用效果最佳的是果糖,菌丝体增殖干质量 1.501 mg mL^{-1} ,是接种量的 136.5 倍,蔗糖、葡萄糖次之。无 C 源的对照处理,没有增殖效果。

(5) 培养液中有效 P 不同含量,对 F9903 菌株菌丝体增殖效果不同。处理 3 含磷酸二氢钾 1 mg mL^{-1} 时,菌丝体干质量达 1.256 mg mL^{-1} ,增殖 114.2 倍。无 P 培养液增殖倍数最低,随着含 P 量的成倍增加,对菌丝体增殖生长有一定影响,但 P 含量达到 8 倍时,菌丝体增殖生长没有发生明显的毒害现象。

参考文献:

- [1] 陈连庆,裴致达,韩宁林,等. 3 种石斛菌根形态结构及元素构成的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 96 ~ 100
- [2] 潘超美,宾金华. 菌根真菌与兰科植物共生关系的研究进展[A]. 见:弓明钦,徐太平,仲崇录,等. 菌根生物多样性及其应用研究[C]. 北京:中国林业出版社, 2000. 63 ~ 67
- [3] 曾宋君,程式君,张京丽. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 75 ~ 80
- [4] 陈连庆,裴致达. 褐环乳牛肝菌液体培养条件的研究[A]. 见:弓明钦,徐太平,仲崇录,等. 菌根生物多样性及其应用研究[C]. 北京:中国林业出版社, 2000. 89 ~ 92
- [5] Chen Lianqing, Pei Zhida. Optimising growth conditions for *Pisolithus tinctorius* inoculum production[A]. In: Brundett, M Dell, B Malajczuk, N et al. Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia. ACIAR Proceedings No. 62[C]. Canberra: ACIAR, 1994. 52 ~ 56
- [6] 弓明钦,陈羽,王凤珍. 三种桉树菌根菌培养条件的研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(1): 1 ~ 5
- [7] 裴致达,陈连庆. 培养液 pH 值对竹荪菌丝体增殖的影响[J]. 中国食用菌, 1995, 14(6): 21 ~ 23

Investigation on Growth Characteristics of *Dendrobium*'s Mycorrhizal Fungi in Liquid-culture

CHEN Lian-qing, PEI Zhi-da, HAN Ning-lin, ZHANG Show-ying

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The investigation shows that the fungus No. F9903 is much better than others. It grew faster, 1.222 cm per day under the most suitable temperature, 30 °C. Although it could be cultivated in the liquid within pH 3 ~ 8, it grew bigger in the pH 7, the total weight of the mycelium up to 1.45 mg mL^{-1} , increase 131.8 times during cultivated period. Among 8 kinds of N sources (ammonium sulfate, ammonium nitrate, calcium nitrate, kalium nitrate, organic urea, ammonium tartrate, glycin, and glutamic acid), ammonium tartrate is the best in absorbing and assimilating this fungus, the total weight is up to 1.684 mg mL^{-1} , 153 times of the originality. Next is the glutamic acid. Giving 8 kinds of C (glucose, fructose, sugar, maltose, ethanol, mannaol, dextrin, dissoluble starch) every one could be used, especially the fructose, the total weight of the mycelium up to 1.501 mg mL^{-1} increase by 136 times. Among the sources of phosphor, kalium phosphate with two hydrogen atom (1 mg mL^{-1}) is the best, the total weight of the mycelium up to 1.256 mg mL^{-1} , increase by 114.2 times.

Key words: *Dendrobium*; mycorrhizal fungi; liquid-cultivate; growth characteristics